

JCS18 U.S. PRO

09/300173



대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 1998년 특허출원 제19469호
Application Number

출원년월일 : 1998년 5월 28일
Date of Application

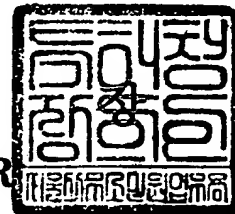
출원인 : 주식회사메디프렉스
Applicant(s)



199 9 년 2 월 10 일

특 허 청

COMMISSIONER



10-98-019469



98.05.28

방식심사관	담 당	심 사 관

【서류명】 특허출원서

【수신처】 특허청장 귀하

【제출일자】 1998.05.28

【발명의 국문명칭】 항혈전성이 있는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도

【발명의 영문명칭】 The development of novel nonthrombogenic agent using heparin

【출원인】

【국문명칭】 광주과학기술원

【영문명칭】 Kwangju Institute of Science and Technology

【대표자】 김효근

【출원인구분】 각급 시험 연구기관

【우편번호】 506-712

【주소】 광주광역시 광산구 쌍암동 572번지

【국적】 KR

【대리인】

【성명】 황이남

【대리인코드】 S090

【전화번호】 02-567-6562

【우편번호】 135-080

【주소】 서울특별시 강남구 역삼동 823-42 (예전빌딩 3층)

【대리인】

【성명】 박형준

【대리인코드】 F145

【전화번호】 02-567-6562

【우편번호】 135-080

【주소】 서울특별시 강남구 역삼동 823-42 (예전빌딩 3층)

【발명자】

【국문성명】 변영로

【영문성명】 BYUN, Young Ro

【주민등록번호】 610227-1051115

【우편번호】 506-712

【주소】 광주광역시 광산구 쌍암동 572번지 광주과학기술원 신소재공학과

【국적】 KR

【발명자】

【국문성명】 이용규

【영문성명】 LEE, Yong Kyu

【주민등록번호】 721216-1389918

【우편번호】 506-712

【주소】 광주광역시 광산구 쌍암동 572번지 광주과학기술원 신소재공학과

【국적】 KR

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

황이남



대리인

박형준

(인)



【심사청구】 특허법 제60조의 규정에 의하여 위와 같이 출원심사를 청구한다.

대리인

황이남



대리인

박형준

(인)



【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	9 면	9,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	9 항	397,000 원
【합계】		435,000 원

【첨부서류】 1. 요약서, 명세서(및 도면) 각 1통

2. 출원서 부분, 요약서, 명세서(및 도면)을 포함하는 FD부분 1통
3. 위임장(및 동 번역문)

【요약서】

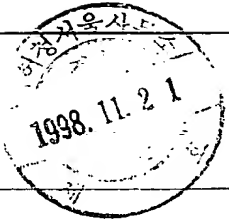


【요약】

본 발명은 항혈전 특성을 갖는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는 환자의 치료에 주사용 항응고제로 널리 사용되고 있는 헤파린을 개질하여 소수성화 시킴으로써 유기용매에 대한 용해도를 증가시켜 주사제이외에 표면개질제 또는 새로운 조절방출형 제재를 제공하는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

본 발명은 헤파린의 개질을 통해 혈관과 접촉하는 모든 의료장비에 적용함으로써 질병을 쉽게 치료하는데 기여할 수 있다. 헤파린의 개질은 인체에 영향을 주지 않는 각각의 디옥시콜릭산(DOCA: deoxy cholic acid), 콜레스테롤, 그리고 알칸노익산(alkanoic acid)을 주성분으로 하여 헤파린의 아민그룹과 결합시킴으로서 생화학적 활성도가 최대한 유지될 수 있다. 이러한 헤파린유도체들의 소수성은 초기반응비율이 증가할 수록 증가하며, 그중에서 알칸노익산이 가장 균일한 양상을 나타내며 소수성 헤파린은 아세톤과 물의 용매(70%아세톤용액)에서 좋은 용해도를 나타냈다. 본 발명에 의한 새로운 소수성 헤파린 유도체는 약물수송시스템을 향상시킬뿐만 아니라, 신장 투석기(kidney dialyer), 심장 폐 산소공급장치(heart lung oxygenator), 심혈관 연결관(Cardiopulmonary bypass circuits)등의 의료장비 코팅물질로 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3a

접수인란			방식심사란	담당	심사관	
<div style="text-align: center;"> 출원인명의변경신고서 61633 </div>						
신고인 (양수인)	성명	주식회사 메디프렉스 대표이사 윤 동 진		주민등록번호		
	주소	서울특별시 용산구 이태원동 22-2				사건과 의관계
대리인	성명	황 이 남 박 형 준	대리인코드	F 145 S 090	전화번호	567-4565
	주소	서울특별시 강남구 역삼동 823-42 (예건빌딩 3층)				
사건의표시	출원번호	1998년 특허출원 제19469 호		출원일자	1998. 5. 28	
발명의명칭		항혈전성이 있는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도				
심사청구사항		○ 심사미청구 (), ○ 심사청구 : 청구일자(98. 5. 28)				
변경원인		상 속() 전부양도(0) 일부양도() 지분포기() 합 병() 기 타()				
신고 내용	변경전 사항	성명	광주과학기술원 원장 김 효 근			
		주소	광주광역시 광산구 쌍암동 572 번지			
	변경후 사항	성명	주식회사 메디프렉스 대표 윤 동 진			
		주소	서울특별시 용산구 이태원동 22-2			
특허법 제 38조 제 4항 · 실용신안법 제 11조 · 의장법 제 24조 및 상표법 제 12조 제 1항의 규정에 의하여 위와 같이 신고합니다.						
<div style="text-align: center;"> 1998 년 11 월 21 일 </div> <div style="text-align: center;"> 대리인(변리사) 황 이 남 박 형 준 </div> <div style="text-align: center;">   </div>						
특 허 청 장 귀 하						
※ 첨부서류 1. 인감증명 1통 2. 양도증 1통 3. 위임장 1통						

【명세서】

【발명의 명칭】

항혈전성이 있는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 헤파린(a)과 헤파린-DOCA(b)의 적외선 분광분석 스펙트럼이다.

도 2 (a)는 개질되지 않은 헤파린의 역상크로마토그래피이다.

(b)는 헤파린-DOCA(7%)의 역상크로마토그래피이다.

(c)는 헤파린-DOCA(9.6%)의 역상크로마토그래피이다.

(d)는 헤파린-DOCA(14%)의 역상크로마토그래피이다.

(e)는 헤파린-DOCA(24%)의 역상크로마토그래피이다.

도 3 (a)는 헤파린-DOCA(9.6%)을 함유한 헤파린 유도체의 역상크로마토그래피이다.

(b)는 헤파린-콜레스테롤(10%)을 함유한 헤파린 유도체의 역상크로마토그래피이다.

(c)는 헤파린-러릭산(7.26%)을 함유한 헤파린 유도체의 역상크로마토그래피이다.

(d)는 헤파린-팔미틱산(8.25%)을 함유한 헤파린 유도체의 역상크로마토그래피이다.

도 4 는 소수성 헤파린의 생화학적 활성도(□:DOCA, ○:콜레스테롤, ▽:팔미틱

산, △:러릭산은 aPTT분석에 의한 결과이며, □:DOCA, ○:콜레스테롤, ▽:팔미탄산, △:러릭산은 FXa 분석에 의한 결과이다.)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 항혈전 특성을 갖는 소수성 헤파린 유도체, 그 제조방법 및 용도에 관한 것이다.

환자의 치료시 항응고제로 널리 사용되고 있는 기존의 헤파린은 강한 친수성으로 인해 주사제로만 사용되어 왔으나 본 발명은 헤파린을 개질하여 소수성화시켜, 주사제이외에 표면개질제 또는 새로운 조절방출형 제재를 제공할 수 있다.

종래의 헤파린은 경구투여나 경피흡수제형으로 사용할 수 없기 때문에 환자들이 잦은 주사 투여로 부터 겪어야 할 고통이 컸다. 따라서 헤파린을 개질시켜 소수성으로 할 수 있다면 환자의 주사 투여로 인한 고통을 줄이는 것 뿐만 아니라 또한, 헤파린의 유기용매에 대한 용해도를 증가시킬 수 있으므로 헤파린을 여러 종류의 고분자 재료와 함께 녹여 헤파린을 혈액과 접촉하는 모든 의료 기기 및 인공장기에 사용이 가능하고, 이들 의료기기 및 인공장기의 사용시 헤파린의 정맥주사가 불필요하다.

이러한 소수성 헤파린을 개발하기 위한 종래기술은 린하트(Jian Liu, Azra Pervin, Cindy M. Gallo, Umesh R. Desai, Connelius L. Van Gorp, and Robert J. Linhardt,

New approaches for the preparation of hydrophobic heparin derivatives, J. Pharm. Sci., 83(7), 1034-1039, 1994)등은 알킬사슬을 헤파린의 핵단백질(core protein)부분에 아민 그룹을 결합시켰다. 헤파린은 분자량이 백만정도되는 프로테오글리칸(proteoglycan)으로 mast cell에서 생합성된 후 조직 내에 존재하는 엔도글리쿠로니다이스(endoglycuronidase)와 프로테아제(protease)에 의하여 분자량이 5,000에서 20,000정도의 글리코사아미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 생성된다. 이 때 약 10%정도의 헤파린이 일부분에 핵단백질(core protein)이라고 하는 아미노 그룹을 함유하고 있다. 한편 알킬사슬은 탄소수가 8, 10, 12, 그리고 18로 각각 되어 있으며, 이들 헤파린의 경우 소수성 성질은 나타내었으나, 미약한 항혈전성도를 나타내었다. 그 외에 헤파린을 저분자량으로 분리한 후 이를 O-아실레이션(O-acylation)으로 소수화시키는 방법이 바르쥬(Barzu, T., Desmouliere, A., Herbert, J. M., Level, M., Herault, J. P., Petitou, M., Lormeau, J. C., Gabbiani, G., Pascal, M., O-acylated heparin derivatives with low anticoagulant activity decrease proliferation and increase alpha-smooth muscle actin expression in cultured arterial smooth muscle cells, EUR., J. Pharmacol., 219, 225-233, 1992.)등에 의해 시도되었으나 소수화된 헤파린은 낮은 항혈전성도를 나타내었다

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

헤파린은 항혈전성 약물로써 임상에 많이 사용되고 있으나 친수성으로 인해 수용액상의 주사제로만 사용되고 있으며 수술과정에서 환자의 몸에서 피가 응고하는 것을 방지하기 위하여 계속해서 혈관주사를 통해 환자에게 투여해야 한다. 또한 혈

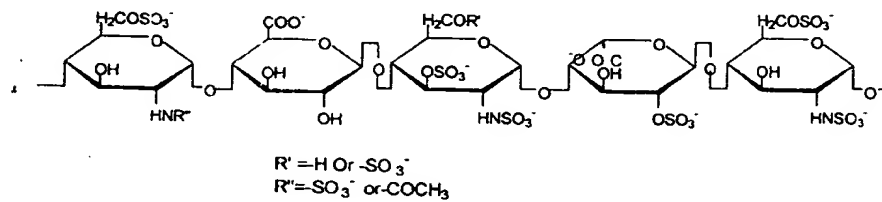
관투석과 같은 의료 기기를 사용할 때에도 혈액응고가 일어날 수 있는 가능성 때문에 헤파린을 혈관주사로 환자에게 투여하며, 인공심장판막을 사용하는 환자에게도 주기적으로 투여하고 있다.

그러나 기존의 헤파린은 주사제 이외의 투여경로가 확립되기 어렵고 제형개발에도 많은 제약이 많이 따르게 된다. 또한 저렴한 가격, 뛰어난 생체 적합성, 우수한 항혈전성을 가지고 있음에도 불구하고 사용되는 범위가 주사제 또는 일부 표면개질제에 국한되어 있다.

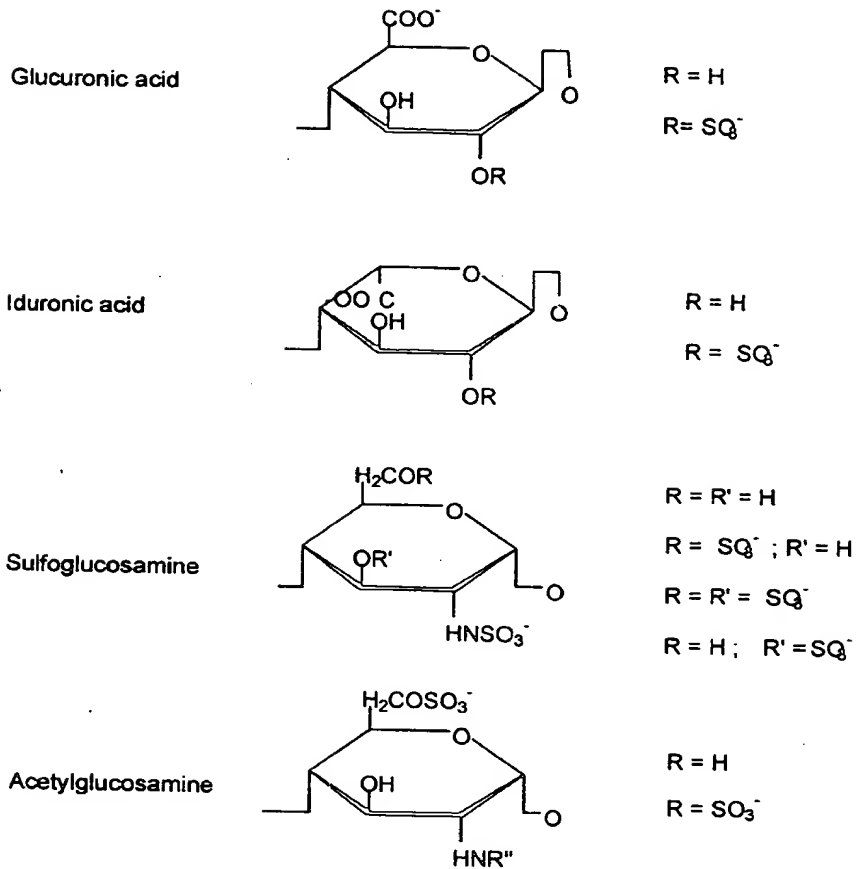
본 발명은 헤파린의 이러한 단점을 보완하기 위하여 항혈전 특성을 갖는 소수성 헤파린 유도체를 제조하는데 있어서 헤파린의 작용기 중에서 아민기와 다른 소수성물질들의 카르복실(COOH) 그룹을 결합시켜 헤파린의 항혈전성에 영향을 최소화한 줄이면서 반응을 유도할 수 있으며, 소수성물질의 선택에 있어서 생체에 적용 가능한 물질인 디옥시콜린산, 콜레스테롤, 그리고 알칸노익산들을 이용한다.

원료물질로 사용한 헤파린(Pharmacia Hepar Franklin OHIO, USA)은 헤파린 나트륨(Heparin Sodium USP beef lung, 140U/mg)으로서 mast cell에서 합성되는 글루코사미노글리겐으로 자연에서 얻어지는 합성물로서 분자량이 60-100KDa인 다당류로 단백질핵(protein core)에 공유결합으로 붙어 있어 전체 분자량은 백만정도이나 현재 상품화 되어 있는 헤파린은 보통 5,000-20,000의 넓은 분자량 분포를 가지고 있으며 본 발명에서 사용된 헤파린은 분자량이 12,000이다. 다음의 구조식과 같이 헤파린의 다당류(polysaccharide) 사슬 구조는 4가지의 단당류로 이루어져 있으며, 이중에서 주 사슬은 D-글루커릭산(D-glucuronic acid)과 L-아이듀오릭산(L-iduronic acid)으로 되어

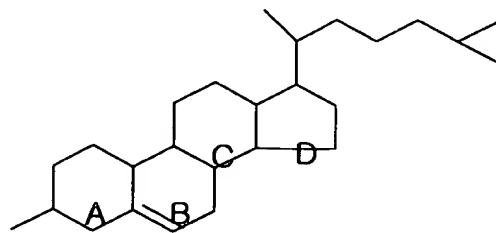
있으며, 모든 결합은 carbon(카본)-ether(에테르) 1-4 결합으로 되어있다. 헤파린의 생체 활성도에 결정적인 역할을 하는 설페이트그룹은 아이듀오릭산과 글루코스아민에 존재하고 또한 자유 아민기는 아세틸 글루코스아민에 존재하고 있는 것을 나타낸다. 다음은 헤파린의 구조식 중에서 헤파린이 AT III와 결합하는 헤파린의 높은 활성도를 갖는 부분의 구조이다.



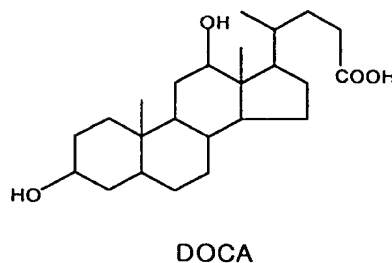
또한 헤파린의 구조를 이루고 있는 카르복실그룹과 아민그룹은 다음과 같다.



콜레스테롤은 다음과 같은 구조식으로 된 시그마(Sigma Chemical Co. St Louis MO)사의 제품으로서 분자량이 387인 것을 사용하였다.



디옥시콜린산(deoxycolic acid)은 다음과 같은 구조를 갖으며 분자량이 392인 시그마(Sigma Chemical Co. St Louis MO)사의 제품을 사용하였다.



【발명의 구성 및 작용】

헤파린을 소수화시키기 위하여 인체에 무해한 소수성물질로서 담즙산 유도체인 디옥시콜린산과 세포막의 구성성분인 콜레스테롤 그리고 긴 알킬사슬을 가진 알칸노익산을 사용하여 이들 각각의 물질을 헤파린과 반응시킨다. 그 결과를 적외선 분광분석스펙트럼(FT-IR)과 핵자기 공명 분석에 의해 합성여부를 확인하고 헤파린유도체 내에 소수성물질의 함량을 조사하기 위해 빛산란장치로 분자량을 측정한다. 소수화된 헤파린의 물리적 특성을 파악하기 위해서 역상 크로마토그래피에 의한 분석과 유기용매에서의 용해도를 측정한다. 또한 소수성 헤파린의 생화학적 활성도를 확인하기 위하여 aPTT(activated partial thromboplastin time)와 Factor Xa 분석한다.

*헤파린과 소수성 물질의 합성

디옥시콜린산(DOCA) 196mg을 디메틸포름아마이드(DMF:dimethylformamide) 5ml에 용해하고, 디사이클로헥실카보디이미드(DCC:dicyclohexylcarbodiimide) 165mg를

DMF 5ml에 용해한 후 상기 용액을 혼합하고 하이드록시숙시미드(HOSu:N-hydroxysuccimide) 92mg를 DMF 5ml에 녹인 후 서서히 상기 용액에 가한다. 상온에서 10시간정도 반응시키면 디사이크로헥실우레아(DCU:dicyclohexylurea)가 형성되어 침전되며 0.45 μ m 멤브레인 필터(membrane filter)에 거른 용액을 상온에서 헤파린 용액과 4시간 반응시킨다. 헤파린용액은 100mg의 헤파린을 5ml의 증류수에 용해하여 준비한다. 최종적으로 반응한 결과 다른 불순물 즉 미반응된 DOCA, DCC, 그리고 HOSu가 잔류한다. 이러한 불순물들은 물에 침전시켜 투석을 이용해서 반응물을 분리한다. 이때 반응한 DOCA : DCC : HOSu의 비율은 1 : 1.6 : 1.6이다. 수용액중에 있는 생성물들은 냉동건조기에서 2일간 충분히 건조시켜 얻는다. 또한 알카노익산과 같은 긴 체인을 가지고 있는 카르복실 그룹도 상기와 같은 방식으로 반응시켜 생성물을 얻는다. 반면에 콜레스테롤은 하이드록실 그룹만을 가지고 있으므로 클로로아세틱산으로 하이드록실기를 카르복실기 그룹으로 전환한 다음 헤파린과 결합시킨다.

* 헤파린의 소수성화

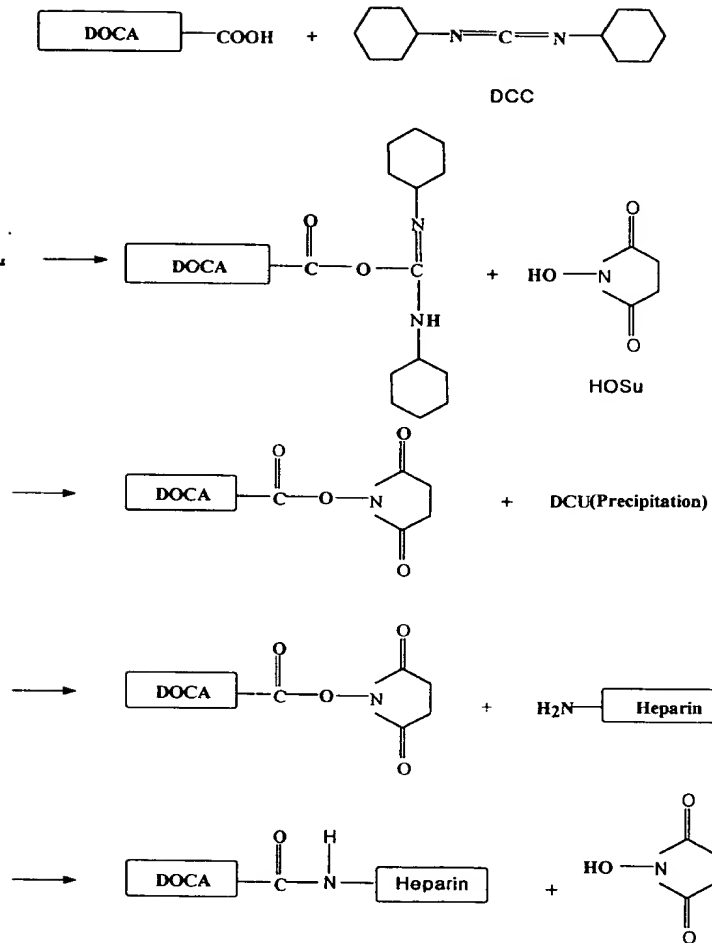
헤파린은 아민기 이외에 카르복실기, 설펜기, 그리고 하이드록실기 등의 음이온을 함유하고 있기 때문에 헤파린의 구조를 변경하면 생화학적 활성도가 감소한다. 이중에서 설펜기나 카르복실기를 치환하면 전혀 항혈전성이 나타나지 않는 반면에 아민기를 치환하면 항혈전성도 100%까지 유지하는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에서는 항혈전성에 전혀 영향을 주지 않는 헤파린의 아민기와 DOCA의 카르복실기를 이용하여 두 물질을 결합시키고자 하였다. 이러한 결합은 먼저 헤파린의 아민



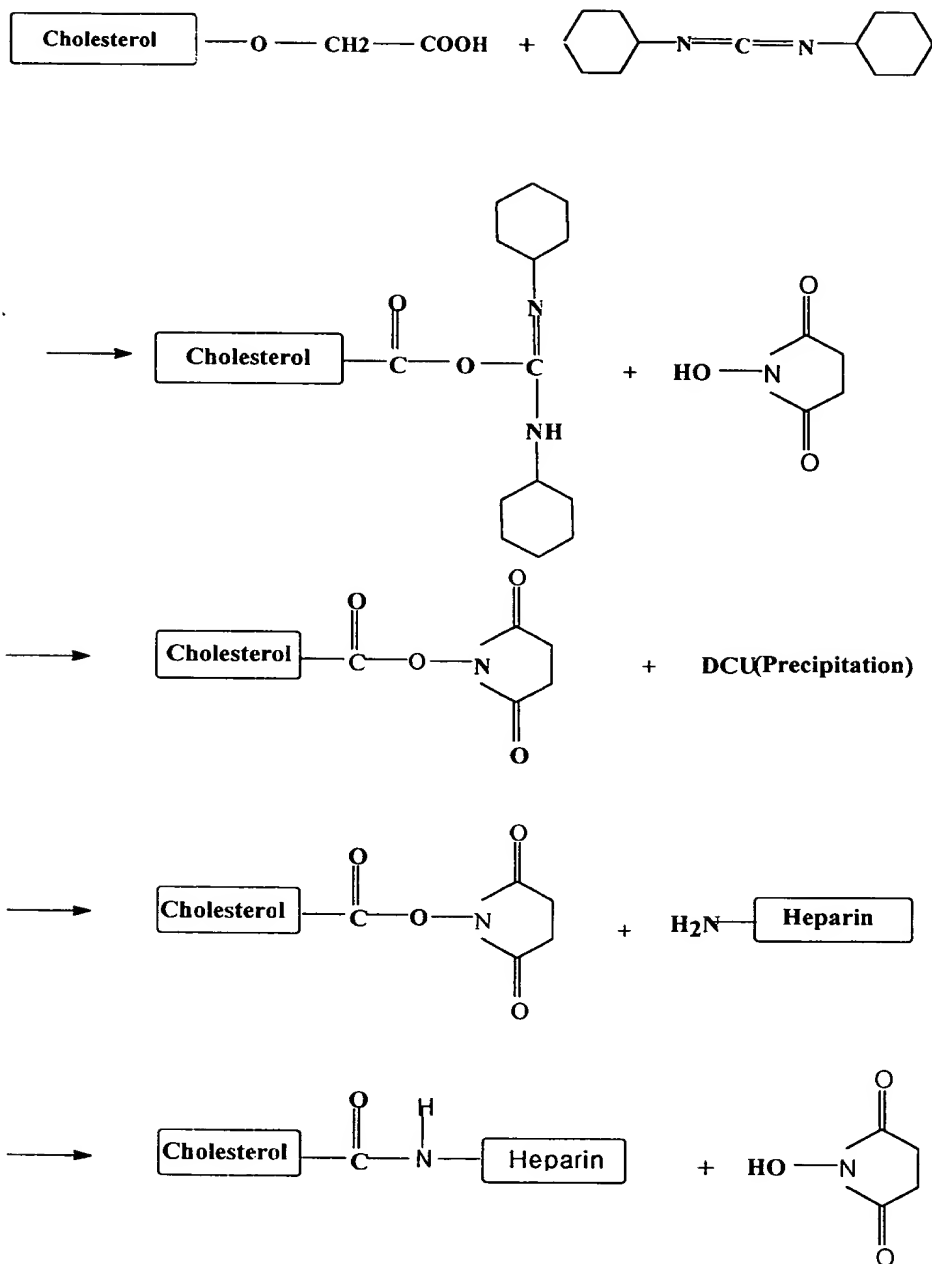
그룹과 결합하기 전에 DOCA의 카르복실기 그룹을 먼저 활성화시킨 후 헤파린과 결합하는 방법을 사용하였다. 또한 헤파린내의 아민기는 기능성 그룹의 약 7%를 차지하고 있으므로 소수성물질의 카르복실그룹 활성화를 위하여 DCC와 HOSu를 이용하여 부반응을 방지한다. 한편 헤파린은 친수성으로 인해 물과 포름아마이드에만 용해되므로 헤파린을 고분자 표면에 물리적으로 혼합시키기 위해서는 헤파린이 소수성 성질을 띠고 있어야 한다. 이러한 소수성 헤파린이 유기용매나 유기용매-물 혼합용매에 잘 용해되기 위하여 헤파린과 소수성 물질과의 합성비율을 조정하였다.

이상과 같이하여 얻은 소수성 헤파린 유도체로서 헤파린-디옥시카르복실산, 헤파린-콜레스테롤, 헤파린-알카노익산 결합체를 다음과 같다.

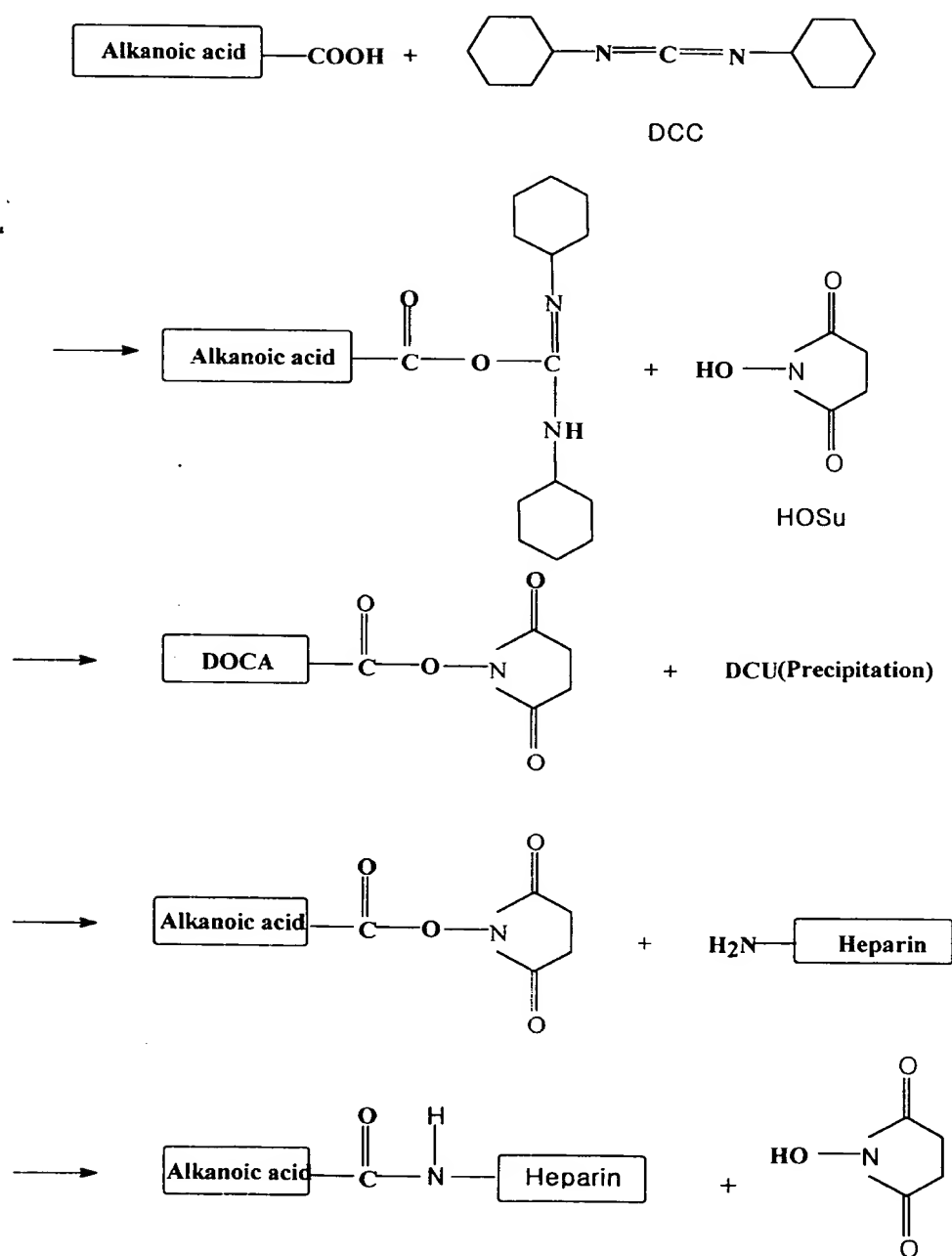
HOSu와 DCC를 이용한 헤파린-DOCA의 합성반응식과 이들의 결합체는 다음과 같다.



클로로아세트산을 이용한 헤파린-콜레스테롤의 합성반응식과 이들의 결합체는 다음과 같다.



HOSu와 DCC를 이용한 헤파린-알카노익산의 합성반응식과 이들의 결합체는 다음과 같다.



< 실시예 1 >

각각의 DOCA, DCC, 그리고 HOSu를 DMF에 용해시켜 10시간동안 반응시킨 후, 반응 결과 활성화된 DOCA를 헤파린 수용액과 4시간동안 반응시킨다. 이때 헤파린의 평균분자량이 12,000달톤이며 생화학적 활성도는 140U/mg이다. 이와 같은 반응으로 액체 상태의 생성물과 고체 형태의 생성물을 얻고, 이중에서 액체 상태의 생성물 속에는 미반응된 DCC, DOCA, HOSu, 그리고 다른 불순물이 함유될 경우 물에 녹지 않기 때문에 투석방법을 이용하여 완전히 제거하며 침전물은 0.45 μ m 필터멤브레인 에 의해서 거른 다음, 순수한 소수성 헤파린은 액체질소에 얼린 후 냉동건조 시킨다.

< 실시예 2 >

헤파린과 알카노익산의 결합체를 제조하기 위하여 실시예1과 같은 방법으로 하여 알카노익산중에서 탄소수가 각각 12인 러릭산(lauric acid, 분자량: 200.32 Aldrich Chemical Company Inc)과 16인 팔믹틱산(palmitic acid, 분자량: 256.43)을 사용하였다. 러릭산을 헤파린과 결합하기 위하여 러릭산의 카르복실기그룹을 활성화 시키기 위하여 러릭산, DCC, HOSu를 각각 DMF에 용해한 후 질소를 충전하여 세 가지 용액을 10시간 반응시켰다. 10시간이 경과하면 DCU가 침전되고 미반응된 DCC, HOSu 등의 불순물은 물을 첨가시켜 제거하고 남은 활성화된 러릭산을 헤파린의 아민그룹과 결합시키기 위하여 활성화된 러릭산과 헤파린을 각각 DMF와 물에 일정량을 용해한 후 4시간동안 반응시킨다. 이때 반응비율은 60 : 1 = 러릭산 : 헤파린으로 몰비를 고정시킨다. 이렇게 생성된 헤파린은 액체상태로 존재하므로 다른 불순물과 분

리하기 위해서 막 투석방법을 사용한다. 액체상태의 생성물을 먼저 멤브레인 (Molecular weight cut off(MWCO) : 3500, 직경: 29mm)에서 약 이틀 동안 용매로 물을 사용하여 분리시킨 바, 이 과정에서 수불용성 불순물들과 DMF가 완전히 제거되었다. 남은 생성물은 냉동건조기에서 2일 동안 건조시켜 헤파린-알카노익산 결합체를 얻었다.

< 실시예 3>

<실시예 2>와 동일하게 하여 헤파린을 탄소수가 16인 팔믹틱산(palmitic acid, 분량: 256.43 Aldrich Chemical Company Inc)과 결합시켜 헤파린-팔믹틱산 결합체를 얻었다.

< 실시예 4 >

헤파린과 콜레스테롤을 결합시키는데 있어서, 콜레스테롤의 구조중에 하이드록실기를 헤파린과 결합할 수 있는 관능기로 전환시키기 위하여 클로로아세트산의 카르복실기를 이용하여 하이드록실기를 카르복실기로 전환하였다. 전환된 콜레스테롤의 카르복실기를 활성화시키기 위하여 HOSu와 DCC를 이용하여 카르복실기를 활성화시킨 후 카르복실기는 헤파린의 아민그룹과 반응시켜 헤파린-콜레스테롤 결합체를 합성하였다. 헤파린-콜레스테롤의 정제는 실시예1의 헤파린-DOCA와 동일하게 물을 이용한 막투석방법과 마이크로필터를 이용하여 제거하고 남은 용액은 액체질소로 냉동 건조시켰다.

< 시험예 1>

제조된 헤파린 유도체는 적외선 분광분석 스펙트럼(FT-IR)과 핵자기 공명장치

(NMR)에 의해 분석하였던바 헤파린과 소수성 물질과의 합성결과는 새로운 소수성물질의 카르복실기의 생성과 헤파린내의 아마이드결합의 생성으로 도1과 같이 확인되었다. 그 결과, 적외선 분광분석 스펙트럼에서 헤파린과 소수성 물질사이의 아마이드결합 생성이 도1(a) $1,585\text{cm}^{-1}$ 에서 흡수파장이 나타났다. 또한 아마이드결합에서 소수성물질의 C=O이중결합이 도1(b) $1,720\text{ cm}^{-1}$ 에서 흡수파장이 나타났다. ^1H -핵자기 공명분석에 의해서, 헤파린-DOCA의 흡수파장이 $\delta 7.58$ (아마이드 결합의 수소원자), $\delta 5.5$ (글루코스아민 2, 6-다이설페이트), $\delta 5.35$ (글루코스아민 2-설페이트의 수소-1), $\delta 5.2$ (아이듀오릭산 2-설페이트의 수소-1)이었으며 헤파린-콜레스테롤의 콜레스테롤 흡수파장이 $\delta 0.69$ (3H 18-H₃), $0.7 \sim 2.40$ (28H, 콜레스테롤 1-H₂, 4-H₂, 7-H₂, 8-H₁, 9-H₁, 11-H₂, 14-H₁, 15-H₂, 16-H₂, 17-H₁, 20-H₁, 22-H₂, 23-H₂, 24-H₂, 그리고 25-H₁), $\delta 1.02$ (3H, 19H-H₃), $\delta 3.5$ (1H, 3-H₁), $\delta 5.36$ (1H, 6-H₁)가 나왔고 헤파린의 흡수파장은 $\delta 7.58$ (아마이드 결합의 수소원자), $\delta 5.5$ (글루코스아민 2, 6-다이설페이트), $\delta 5.35$ (글루코스아민 2-설페이트의 수소-1), $\delta 5.2$ (아이듀오릭산 2-설페이트의 수소-1)이었으며 헤파린-알카노익산의 경우 헤파린-콜레스테롤과 비슷한 결과가 나왔다. 한편 ^{13}C -핵자기공명분석에서는 헤파린-DOCA 경우 178ppm근처에서 새로운 아마이드결합이 생성되었다.

< 시험예 2 >

Pharmacia Hepar Co(Franklin OH)으로 부터 구입한 페닐-세파로스 CL-4B는 각각의 헤파린-DOCA, 헤파린-콜레스테롤, 그리고 헤파린-알카노익산의 소수성 정도를 확인하는데, 사용되었다. 컬럼(HR 16/30 I.D.)은 10배의 물로 세척한 후 50mM PBS

완충용액(pH 7.0)과 1.7M 황산암모늄(ammonium sulfate)을 함유한 PBS 완충용액으로 각각 20분씩 평형화시켰다. 이와 같이 충전된 컬럼은 역상크로마토그래피의 원리를 이용한 것이며, 특히, 황산암모늄은 헤파린의 소수성 정도를 확인하는데 가장 적절한 용액이다.

소수성의 차이를 확인하기 위하여 동일한 PBS완충용액을 이용하여 각각의 상품화된 헤파린과 합성된 소수성 헤파린(5mg/5ml)을 용해시켜 컬럼으로 투입시킨다. 이때의 유속은 1ml/min이며 농도구배는 처음 20분 동안에는 친수성성질을 가진 순수 PBS완충용액으로, 그 다음 60분 동안은 암모니움설페이트를 농도구배로 걸어주면서 샘플의 소수성정도를 분석하였다. 이렇게 유출된 용액은 분율수집기장치(fraction collector)에 의해 2ml씩 시험관 튜브에 받은 용액을 헤파린의 존재유무와 농도를 확인할 수 있는 azure A(농도: 0.01mg/ml)염색용액을 첨가한다. 1분 정도 반응을 시킨 후 UV스펙트로미터장치에 의해서 500nm 흡수파장으로부터 소수성헤파린의 양을 계산하였던 바 개질되지 않은 헤파린의 피크는 단지 친수성용매인 PBS 완충용액에서만 나타났고, 다른 소수화된 헤파린은 소수성용매인 암모니움설페이트농도구배에서만 피크가 나타났다. 다른 물질로 소수화 시킨 물질들의 피크들을 살펴보면 소수성 물질의 양에 따라 또는 소수성물질의 종류에 따라 피크의 양상이 다르게 나타났다. 즉 소수성물질인 DOCA양이 24%의 경우에는 상대적으로 피크가 균등하게 나왔고 낮은 농도의 암모니움설페이트영역에서는 비교적 낮은 양의 헤파린-DOCA가 검출되었다(도2).

헤파린 유도체의 소수성정도를 크로마토그래피를 통해서 관찰하였는데 도 3에

서와 같이 7.26에서 10%까지 서로 다른 소수성물질과 결합한 헤파린 유도체의 피크를 살펴보면, 러릭산이나 팔믹틱산이 가장 균일한 피크의 양상을 보여주었다. 반면에 콜레스테롤과 DOCA를 함유한 헤파린의 경우에는 비교적 넓은 소수성 분포를 보였다.

< 시험예 3 >

합성된 헤파린유도체에서 소수성물질의 함량은 빛 산란장치(light scattering)에 의해서 절대분자량을 측정함으로써 결정되었다. 이장치는 488nm의 아르곤이온 레이저를 이용한 장치이며, Malvern Instruments Ltd.(시리즈 4700)에서 구매하였다. 먼저 헤파린과 소수성헤파린을 각각 4가지 농도(1.25, 2.5, 5, 그리고 10mg/ml)로 물 또는 물과 메탄올용매를 사용하여 만들었다. 이렇게 만든 농도들은 산란되는 세기를 측정하기 위해서 40 °에서 140 °까지 각도를 바꾸면서 10번씩 빛의 세기를 측정함으로써 분자량을 자동으로 계산하였다. 이렇게 측정된 헤파린의 분자량과 다른 소수성헤파린의 분자량을 비교함으로써 소수성 물질의 함량을 얻었다(표 1). 또한, 헤파린의 생화학적 활성도는 aPTT와 Factor Xa(크로모제닉 분석)방법에 의해 결정되었다. aPTT 분석방법은 혈액응고반응에서 혈전요소의 결핍을 조사하거나 헤파린의 반응을 조사하는데 적절한 방법으로 정확도가 상당히 우수하다. 혈소판이 최대로 제거된 혈장을 한국적십자에서 구매한 것을 37℃에서 숙성시킨 후 0.1ml의 aPTT 용액을 신속하게 PPP용액에 가하고 2분간 반응시킨 후 0.1ml의 칼슘크로라이드를 반응용액에 가한다. 이때 칼슘크로라이드를 가한 후 피브린 덩어리가 생기는 시간을 피브린응고 측정장치(fibrometer)에 의해 기록한다. Factor Xa 분석은 헤파린이 안티트롬빈(antithrombin)

III와 결합하여 factor Xa을 억제하는 효과를 이용하는 것으로 분석절차는 Sigma Co.에서 제공된 설명서에 따라 분석하였다. 그 결과, 제조된 모든 헤파린 유도체들은 70%이상의 생화학적 활성도를 나타냈고 또한 소수성물질에 관계없이 대부분이 비슷한 소수성정도를 나타냈다. 7%정도의 DOCA 함유하고 있는 헤파린 유도체는 각각 aPTT에서는 93%와 FXa분석에서는 80%의 높은 생화학적 활성도를 나타낸 반면에, 24%DOCA를 함유한 소수성헤파린은 70%정도의 생화학적 활성도를 보였다.

표 1. 소수성헤파린의 생성율과 초기반응비율에 따른 소수성물질의 함량변화

초기 반응비율 (헤파린:DOCA)	분자량	DOCA의 함량	생성물의 수득율(%)
1:6	13357	7.0%	77
1:16	13706	9.6%	74.8
1:60	14403	14.0%	71.8
1:85	14759	16.0%	72.9
1:200	16320	24.0%	73

초기 반응비율 (헤파린:콜레스테롤)	분자량	콜레스테롤의 함량	생성물의 수득율(%)
1:6	13151	5.8%	77
1:16	13288	6.8%	78
1:60	13791	10.0%	74
1:85	14077	12.0%	72.9
1:200	15500	20.0%	73

물질(초기반응비)	분자량	알카노익산 함량	수득율(%)
헤파린-러릭산(1:60)	13400	7.56%	76
헤파린-팔믹틱산(1:60)	13500	8.25%	77

표 1은 소수성 헤파린의 수득율과 초기 반응비율에 따른 소수성 헤파린의 분자량 분포를 나타낸 표이다. 분자량은 빛 산란장치에 의해 측정된 값이며, 분자량의 측정으로 헤파린 유도체내에 소수성 물질이 얼마나 함유하고 있는지를 확인할 수 있었다. 헤파린의 분자량 측정결과 12,386달톤이 나왔고, 헤파린과 DOCA를 1:200으로 반응시킬 경우, 분자량은 16,320으로 24%의 DOCA를 함유하고 있다. 또한, 헤파린과 콜레스테롤을 1:6에서 1:200까지 결합시킬 경우수득율이 73에서 78%까지 보였다. 그러나 소수성 헤파린에서의 콜레스테롤의 함량은 같은 조건에서 헤파린-DOCA의 DOCA의 양보다 적게 함유되어 있는 것으로 나타났다. 헤파린과 알카노익산의 반응에서는 서로 같은 반응비율에서 비슷한 수득율을 나타냈다.

표 2는 헤파린-DOCA와 헤파린을 가지고 아세톤 또는 아세톤-물 용매에서의 용해도를 측정한 실험이다. 먼저 용해도를 측정하기 위해 농도는 1 무게/부피%로 정하고 약 2일간 진탕하여 염색용액으로 헤파린이 용해정도를 측정한 결과 헤파린은 순수한 물에만 녹는 반면 7%에서 14% DOCA를 함유하고 있는 헤파린 유도체는 50:50 용매에 용해되고 24% DOCA를 함유하고 있는 헤파린-DOCA의 경우에는 최대 30:70의 아세톤-물 용매에 잘 용해되었다.

표 2. 헤파린-DOCA에서 DOCA의 함량에 따른 용해도의 차이

물:아세톤 (부피비%)	헤파린	헤파린-DOCA (7%)	헤파린-DOCA (14%)	헤파린-DOCA (24%)
100:0	O	O	O	O
70:30	X	O	O	O
50:50	X	O	O	O
30:70	X	X	X	O
0:100	X	X	X	X

O : 잘 녹음, X: 녹지않음

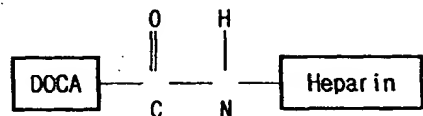
【발명의 효과】

본 발명의 개질된 소수성 헤파린은 유기용매에 대한 용해도를 증가 시킬 수 있으므로 여경로를 다양화할 수 있고 헤파린을 여러 종류의 고분자 재료와 함께 녹여 헤파린을 혈액과 접촉하는 의료기기 및 인공장기의 사용시 헤파린의 정맥주사가 불필요하다. 또한 혈관과 접촉하는 모든 의료장비, 혈관 확장 수술 후 재발될 수 있는 연근육 세포(smooth muscle cell)의 증식방지물질, 신체에 사용되는 모든 인공장치, 새로운 헤파린의 약물전달 시스템, 설하흡수제형 또는 경피흡수제형, 단백질수송을 위한 운반등에 효과적으로 이용될 수 있다.

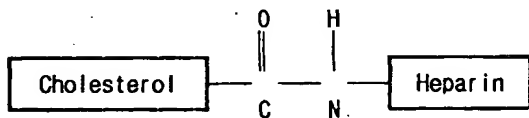
【특허청구범위】

【청구항 1】

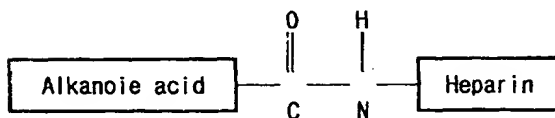
높은 항혈전성과 용해성을 갖는 헤파린 유도체에 있어서, 헤파린과 소수성물질을 결합시켜 얻은 헤파린-디옥시콜린산 결합체, 헤파린-콜레스테롤 결합체, 헤파린-알카노익산 결합체로서 다음과 같은 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체.



헤파린-DOCA 결합체



헤파린-콜레스테롤 결합체



헤파린-알칸노익산 결합체

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 헤파린 유도체의 생화학적 활성도값이 70%이상 유지되는 것을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 소수성물질은 디옥시콜린산, 콜레스테롤, 알카노익산인 것을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체.

【청구항 4】

제 1 항 또는 제 3 항에 있어서, 콜레스테롤은 분자량이 387~392이고, 알카노익산은 러릭산 또는 팔미틱산임 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체.

【청구항 5】

소수성 물질인 디옥시콜린산, 콜레스테롤 그리고 알카노익산 중의 하나를 헤파린과 결합시킴을 특징으로 하는 항혈전 특성을 갖는 소수성 헤파린 유도체의 제조 방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 헤파린과 디옥시콜린산의 결합은, 디옥시콜린산의 카르복실기를 N-하이드록시숙시미드와 디시클로헥실카보디이미드로 활성화시키는 단계와 활성화된 디옥시카르복실산과 헤파린의 아민기를 화학적으로 결합시키는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체의 제조방법.

【청구항 7】

제 5 항에 있어서, 헤파린과 콜레스테롤의 결합은, 콜레스테롤의 하이드록실기를 클로로아세트산을 이용하여 카르복실기로 전환하는 단계와, 전환된 콜레스테롤 카르복실기를 활성화시키기 위하여 N-하이드록시숙시미드와 디시클로헥실카보디이미드로 활성화시키는 단계와, 활성화된 콜레스테롤 카르복실기를 헤파린의 아민기와 반응시키는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체의 제조방법.

【청구항 8】

제 5 항에 있어서, 헤파린과 알카노익산의 결합은, 러릭산 또는 팔미틱산의 카르복실기를 N-하이드록시숙시미드와 디시클로헥실카보디이미드로 활성화시키는 단계와 활성화된 알카노익산의 카르복실기를 헤파린의 아민기와 화학적으로 결합시키는 단계로 이루어짐을 특징으로 하는 항혈전 특성이 있는 소수성 헤파린 유도체의 제조방법.

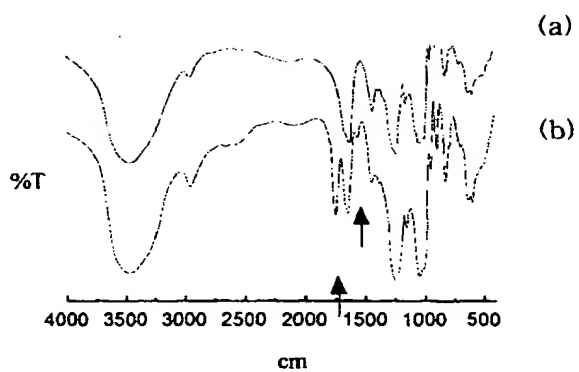
【청구항 9】

혈액응고 방지 또는 혈관과 접촉하는 의료장비, 혈관 확장 수술시 연근육 세포 (smooth muscle cell)의 증식방지물질, 신체에 사용되는 인공장기, 헤파린의 약물전달 시스템, 설하흡수제형 또는 경피흡수제형, 단백질수송을 위한 운반등에 소수성 헤파린 유도체를 사용하는 용도.

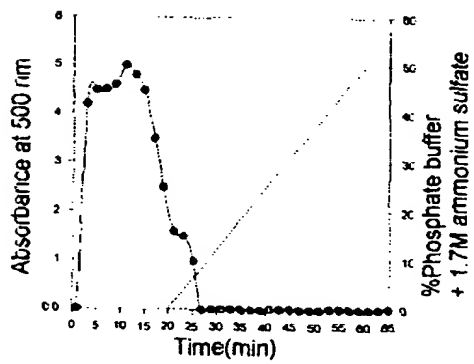


【도 면】

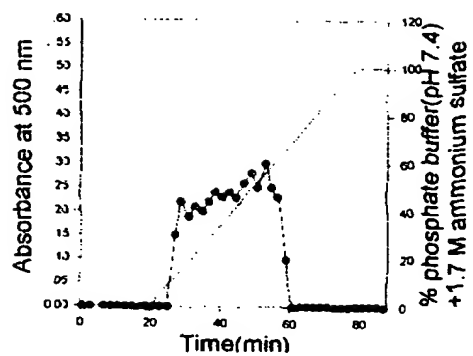
【도 1】



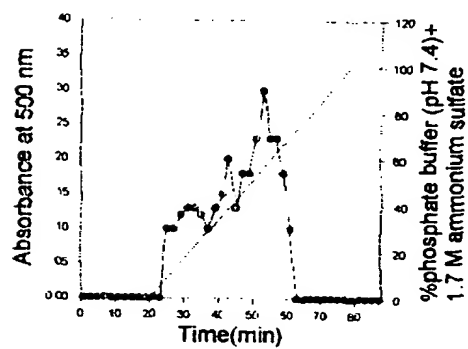
【도 2a】



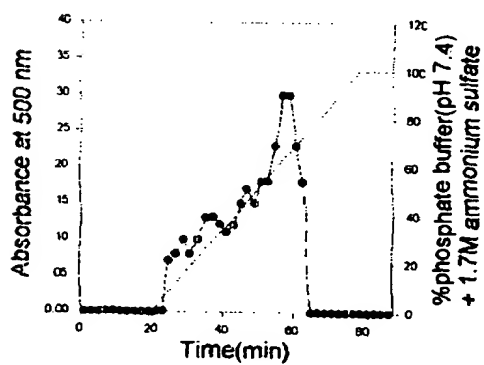
【図 2b】



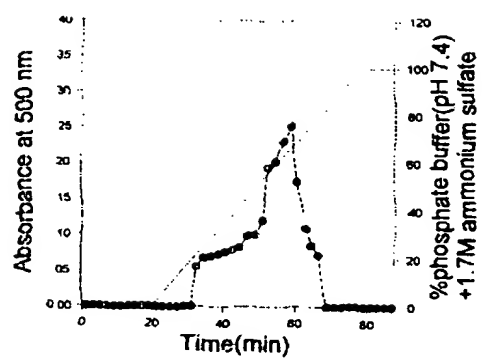
【図 2c】



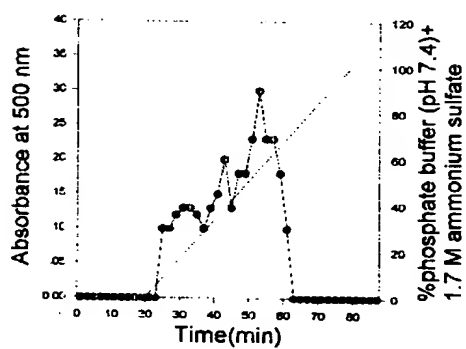
【図 2d】



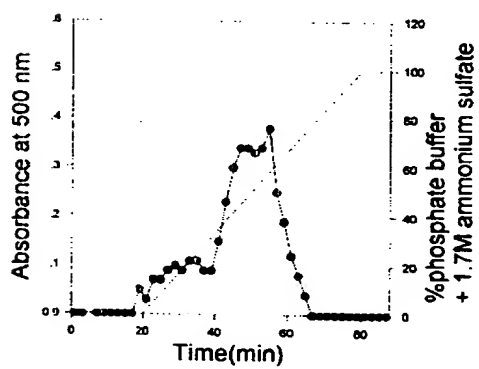
【図 2e】



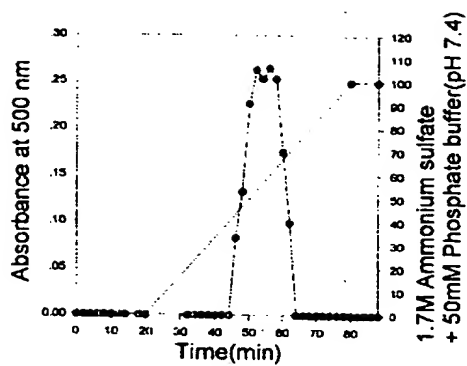
【図 3a】



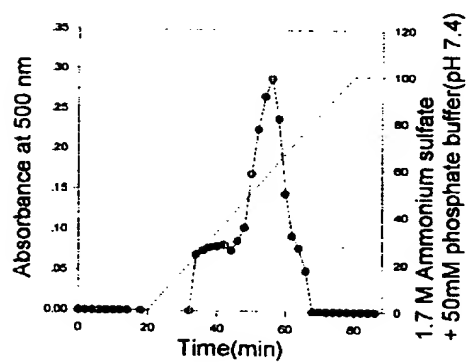
【図 3b】



【図 3c】



【図 3d】



【図 4】

